

幼羊颅骨缺损模型中颅骨组织 *Dlx2* 基因的表达及意义分析

毕玉杰^{1#}, 周昊^{1#}, 崔阳¹, 邵国^{2,3,4}, 张春阳^{1*}

(1. 内蒙古科技大学包头医学院第一附属医院神经外科, 包头 014010; 2. 内蒙古包头医学院生物医学研究中心, 包头 014040; 3. 内蒙古科技大学包头医学院生物化学及分子生物学教研室, 包头 014040; 4. 首都医科大学宣武医院低氧适应转化医学北京市重点实验室, 北京 100053)

【摘要】 目的 检测 *Dlx2* 基因在小尾寒羊颅骨缺损模型颅骨组织中的表达, 探讨其对颅骨缺损的意义。**方法** 选取 10 只 1 月龄小尾寒羊, 建立颅骨缺损模型, 对缺损部位的新生颅骨组织及邻近缺损部位的原生颅骨组织进行取材, 应用 Real-time PCR 和 Western blot 技术检测 *Dlx2* 的 mRNA 和蛋白表达水平。**结果** 与邻近缺损部位的原生颅骨组织比较, 缺损部位的新生颅骨组织 *Dlx2* mRNA 和蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。**结论** *Dlx2* 基因表达增加可能对颅骨缺损修复有重要意义。

【关键词】 颅骨; 修复; PCR; *Dlx2* 基因

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 10-0073-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.10.012

Expression and significance of *Dlx2* gene in skull defect model of young sheep

BI Yujie^{1#}, ZHOU Hao^{1#}, CUI Yang¹, SHAO Guo^{2,3,4}, ZHANG Chunyang^{1*}

(1. Department of Neurosurgery in The First Affiliated Hospital of Baotou Medical College of Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014010, China; 2. Biomedicine Research Center, Baotou 014040; 3. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Baotou Medical College of Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014040; 4. Beijing Key Laboratory of Hypoxic Conditioning Translational Medicine, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053)

【Abstract】 Objective To determine the expression of the *Dlx2* gene in skull tissue of the small-tailed Han sheep skull defect model, and to investigate its significance in this skull defect. **Methods** Ten small-tailed Han sheep aged one month old were selected to establish the skull defect model. Newborn skull tissue in the defect area and native skull tissue adjacent to the defect area were collected. *Dlx2* expression at the mRNA and protein levels was determined by real-time PCR and western blotting. **Results** Compared with the levels in native skull tissue adjacent to the defect area, the *Dlx2* mRNA and protein expression of newborn skull tissue in the defect area was significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusions** Increased *Dlx2* gene expression may play an important role in the repair of skull defects.

【Keywords】 skull; repair; PCR; *Dlx2* gene

【基金项目】 国家自然科学基金 (81360164、81660214), 内蒙古自然科学基金 (2015MS0866, 2015MS0859), 包头市医药卫生基金 (wsjj2016042, 2015S2004-5-10), 包头医学院科学基金 (BYJJ-YF201697, BYJJ-QM2016119)。

【作者简介】 毕玉杰 (1989—), 女, 住院医师, 在读硕士研究生, 研究方向: 颅骨缺损与颅脑损伤, E-mail: 191724554@qq.com。

周昊 (1989—), 男, 在读硕士研究生, E-mail: 15832327077@163.com。#共同第一作者

【通信作者】 张春阳 (1964—), 男, 主任医师, 医学硕士, 研究方向: 颅骨缺损与颅脑损伤。E-mail: zhangchunyang_1964@aliyun.com

各种原因造成的小儿外伤的发生率日益升高,在各类外伤中,颅脑外伤位居首位。颅骨作为脑组织的天然保护屏障,若其受到损伤,后果不堪设想。尤其对于小儿这一特殊群体,正处于生长发育的关键时期,若颅骨修补的选择不当,可能会对小儿的一生造成难以想象的后果^[1]。截止目前,针对小儿颅骨缺损的修复问题,尚缺乏理想的修复方案,学者们纷纷从修复的必要性、时机、材料选择等各个宏观的角度进行了研究^[2-3],而利用组织病理学、分子生物学技术和生物信息方法,从组织、细胞、分子和信号传导途径等层面,研究如何修复缺损区的颅骨组织可能还需进一步的补充。

Dlx 基因家族是同源盒基因系的一个分支,包括 *DLx2*、*DLx3*、*DLx5* 等,这些基因在颌面骨的发育中起重要作用^[4-6]。剔除 *DLx2* 基因的新生小鼠出生后就死亡,并发现第一鳃弓衍化为畸形上颌突且(或)长骨发育异常^[7-8]。*DLx3* 诱导的成骨细胞骨形态发生蛋白 2(BMP-2)是通过 p38/Smad5 信号通路调控^[6]。*DLx5* 是 BMP 信号通路的靶基因,并且在骨形成和胚轴背腹侧的形成中起重要调控作用^[5]。这些结果提示 *DLx* 基因家族可能在颌面骨的发育和分化中起重要的调控作用。

Dlx2 基因作为 *Dlx* 基因家族的一员,在调控细胞周期和凋亡、组织稳态发展、器官形态发育等方面发挥着重要的作用^[9-10]。小儿颅骨的生长方式属于膜性成骨,成骨细胞的作用较活跃,能促进缺损边缘处产生新的骨基质,最后形成富有活力的骨组织^[11]。基质矿化是骨形成过程中的一个重要阶段,也是一个紧密的有规律的过程,*DLx2* 基因在参与调控成骨细胞的矿化过程中起重要作用^[12]。目前关于 *Dlx2* 基因与骨代谢方面的研究多以鼠作为实验动物,且大多局限于细胞层面,选择与人类亲缘更近的绵羊进行研究,探寻幼羊颅骨组织中 *Dlx2* 的表达情况,国内外鲜有报道。本组实验主要利用幼羊缺损模型,观察颅骨缺损区域的新生骨组织中 *Dlx2* 的表达情况,从分子生物学的角度为小儿颅骨缺损的修复提供一定的思路。

1 材料和方法

1.1 实验动物

普通级雌性 1 月龄小尾寒羊 10 只,体重 4.5 ~ 5.2 kg,来源于内蒙古科技大学包头医学院动物实验室[SCXK(蒙)K2016-0003],无菌手术在内蒙古

科技大学包头医学院第一附属医院中心实验室[SYXK(蒙)K2005-0019]进行,动物实验由内蒙古科技大学包头医学院医学生物学研究所动物实验伦理审查委员会通过,伦理审批 IACUC 号:2016-033,实验过程中按 3R 原则给予实验动物人道的关怀。

1.2 主要试剂与仪器

Trizol(美国 Ambion 公司);反转录试剂盒(上海生工,B532445);2XReal-time PCR Mix(南京博尔迪,BR101);*Dlx2* 基因和内参 β -actin 基因的引物(南京金斯瑞);兔源 *Dlx2* 抗体(英国 Abcam 公司,ab28461);兔源 Histone 抗体(美国 cell signaling 公司,#4499);辣根过氧化物酶标记的驴抗兔二抗(北京博奥森公司,bs-0295D);ECL 化学发光显色试剂盒(北京普利莱公司,P1010);枪头与离心管(美国 Axygen 公司)。

自动双重纯水蒸馏仪(上海本波仪器有限公司,SZ-98);立式压力蒸汽灭菌器(日本坪山制作所株式会社,HVE/HVA);干燥箱(上海善志,DHG-9023 A);低温高速离心机(德国 eppendorf 公司,Centrifuge5424 R);小型垂直电泳槽(美国 BIO-RAD 公司,1658001);电泳仪电源(美国 BIO-RAD 公司,1645050);凝胶成像系统(中国天能公司,1600);普通 PCR 仪(美国 MJ Research 公司,26665);超微量紫外分光光度计(美国 Thermo 公司,NanoDrop 2000);ABI7900 荧光定量 PCR 扩增仪(美国 ABI 公司,ABI7900HT FAST);超声波破碎仪(宁波科生超声设备有限公司,JY98-III);常温离心机(北京大龙兴创实验仪器有限公司,D1009);漩涡混合仪(北京大龙兴创实验仪器有限公司,Mx-s);全自动酶标仪(美国 Thermo 公司,Multiskan FC);摇床(美国 Thermo 公司);Western blot 化学发光成像系统(中国天能科技有限公司,Tanon4200SF);微量移液器(北京大龙兴创实验仪器有限公司);-80℃超低温冰箱(美国 Thermo 公司);-20℃冰箱和 4℃冰箱(中国海尔公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 颅骨缺损模型的制作与取材

给予小尾寒羊 3% 戊巴比妥钠溶液按照 1 mL/kg 体重,经颈外静脉注射麻醉后平卧于手术台上,待麻醉满意后进行手术。头顶备皮,在手术室内用 2.5% 的碘伏和 75% 的酒精常规消毒皮肤,铺无菌手术洞巾,无菌条件下,由两眼眶上缘连线中点至

外耳道连线的中点线形切开顶部皮肤,切透骨膜并向两侧牵开,充分暴露颅骨(图 1),用环形铣刀铣出直径 3 cm 大小的颅骨缺损。双氧水和庆大霉素盐水反复冲洗手术区预防感染,将骨膜尽量平整的平铺在颅骨缺损区上,取出牵开器,全层缝合头皮。术后三天,每只羊给予青霉素 320 万单位,分两次肌肉注射。术后七天拆线。10 只幼羊在相同饲养条件下,于 1 个月后宰杀,分别取缺损区新生的骨组织及其邻近的原生骨组织置于事先做好标记的冻存管中,储存在 -80°C 的冰箱中备用。

1.3.2 Real-time PCR 检测颅骨组织 *Dlx2* mRNA 的表达

将 -80°C 冰箱取出的颅骨组织,液氮中冻存过夜,采用 Trizol 法提取颅骨总 RNA,经紫外分光光度计定量。按照上海生工公司反转录试剂盒进行反转录,得到 21 μL 的 cDNA 产物, -20°C 储存。采用南京博尔迪的 2XReal-time Mix,往 ABI 的 96 孔板每孔中加入 cDNA 2 μL , 3' 和 5' 端引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , 2XReal-time Mix 12.5 μL , ddH₂O 9.5 μL , 每个样品设置 3 个复孔,用 ABI7900 Real-time PCR 仪检测各颅骨组织中 *Dlx2* 基因和内参 β -actin 在 mRNA 水平的表达。Real-time PCR 反应体系: 95°C 5 min, 95°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 30 s 循环 40 次,反应体系为 25 μL , 72°C 2 min^[13]。转录因子 *DLx2* 基因的正向引物 5'-AAACGGAAGCCAAAGAAAGTC-3', 反向引物 5'-CGGGAAGTGCCAGGTATTGAG-3'; 内参 β -actin 基因的正向引物 5'-ACCCACACGGTGC CCATC-3', 反向引物 5'-TCCTTGATGTCACGG ACCGATTT-3'。Real-time PCR 反应结束后,记录各样本的 CT 值,结果以 β -actin 为内参进行均一化, $\Delta\text{CT} = \text{CT}_{\text{target}} - \text{CT}_{\beta\text{-actin}}$, 采用 $2^{-\Delta\text{CT}}$ 方法进行定量分析,结果以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示。

1.3.3 Western blot 检测颅骨组织 DLX2 蛋白的表达

将 -80°C 冰箱取出的颅骨组织,液氮中冻存过夜,均加入 RIPA 强裂解液(上海碧云天生物技术有限公司),用手持式匀浆器和超声粉碎的方法,裂解 10 min,将骨组织蛋白全部裂解,离心取上清,加入蛋白酶抑制剂(北京普利莱公司)。总蛋白经 BCA 法定量,加入 6xLoading Buffer 上样缓冲液和抗氧化剂,于 100°C 加热 5 min 使蛋白变性, -20°C 保存备用。取 10 μg 总蛋白于 8% SDS-PAGE 胶中依次行电泳、转膜、5% 的脱脂牛奶封闭, 1xTBST 洗涤后

PVDF 膜上检出目的蛋白和内参蛋白的条带,将膜剪开后,分别加入兔源 *Dlx2* 抗体(1:800, 英国 Abcam 公司)和兔源 Histone 抗体(1:1000, 美国 cell signaling 公司), 4°C 孵育过夜。第 2 日吸弃一抗后, 1xTBST 洗涤 3 次,每次 10 min,加入辣根过氧化物酶标记的驴抗兔二抗(1:1000, 北京博奥森公司)孵育 2 h,再次洗涤后,加入预先配置好的 ECL 发光液(A 液: B 液 = 1:1, 北京普利莱公司),于 Western blot 化学发光成像系统曝光、显影。通过 Image J 软件进行灰度值测量,以 Histone 为内参,各条带灰度值作为目的蛋白 DLX2 的相对表达量。

1.4 统计学分析

采用 GraphPad Prism 进行统计学分析,所有结果以平均数 \pm 标准差 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,每组实验至少重复 5 次,采用 *t* 检验的方法,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

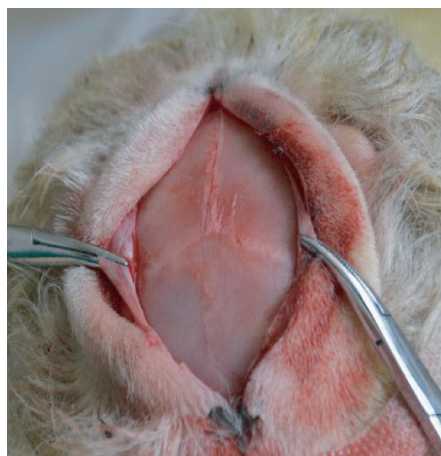


图 1 切开后牵开暴露颅骨

Figure 1 Exposing the skull after opening the scalp

2 结果

2.1 造模情况

造模完成后肉眼观察小尾寒羊颅骨有一直径 3 cm 左右的圆形骨缺损(图 2), 1 个月后宰杀取材。

2.2 *Dlx2* 在缺损区新生骨组织及邻近的原生骨组织中 mRNA 的表达变化

通过对 10 对小尾寒羊颅骨缺损样本进行 Real-time PCR 的检测,比较了缺损区新生骨组织和邻近的原生骨组织中 *Dlx2* mRNA 的表达变化。缺损区新生骨组织中 *Dlx2* 基因的相对丰度值为 (0.04051 ± 0.005465) , 邻近的原生骨组织中 *Dlx2* 基因的相对丰度值为 (0.02388 ± 0.004418) , *Dlx2* 在缺损区

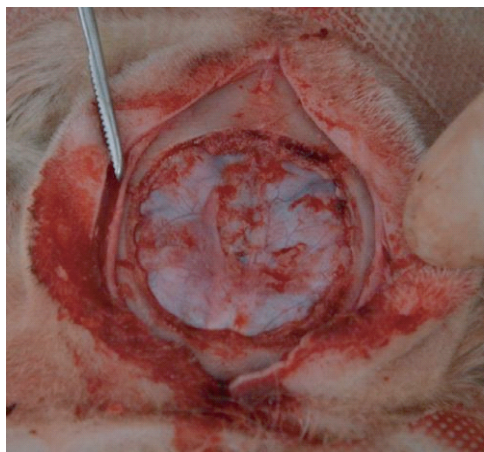


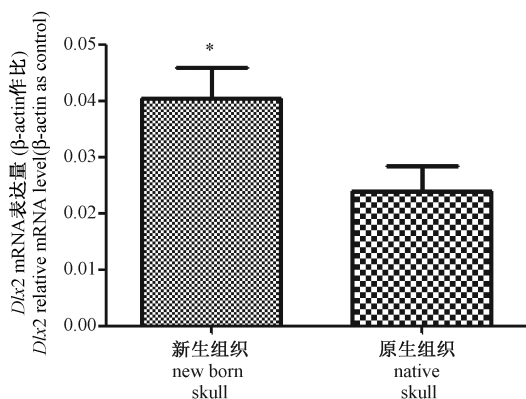
图 2 颅骨缺损模型

Figure 2 Skull bone defect model

新生骨组织中的 mRNA 表达水平高于邻近的原生骨组织($P < 0.05$), 差异有显著性。(图 3)

2.3 DLX2 在缺损区新生骨组织及邻近的原生骨组织中蛋白的表达水平

通过对 10 对小尾寒羊颅骨缺损样本进行 Western blot 的相对灰度值检测, 比较了缺损区新生骨组织和邻近的原生骨组织中 DLX2 蛋白的表达变化。缺损区新生骨组织中 *Dlx2* 基因的相对灰度值为(6.308 ± 0.8227), 邻近的原生骨组织中 *Dlx2* 基因的相对灰度值为(2.328 ± 0.4398), DLX2 在缺损区新生骨组织中的蛋白表达水平高于邻近的原生骨组织($P < 0.05$), 差异有显著性。(图 4)

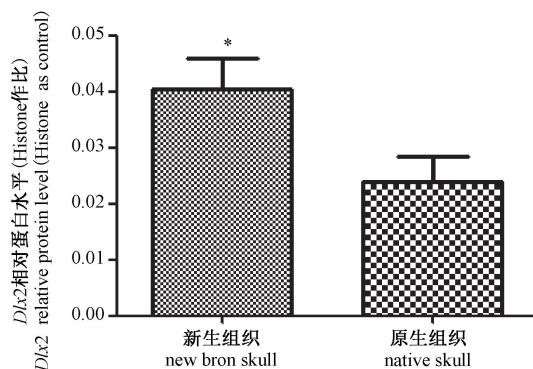


注: 与原生骨组织组比较, $*P < 0.05$ 。

图 3 Real-time PCR 分析颅骨缺损区新生的骨组织及邻近的原生骨组织中 *Dlx2* mRNA 的表达水平

Note. Compared with the native skull group, $*P < 0.05$.

Figure 3 Expression of mRNA *Dlx2* in newborn skull tissue in the tissue adjacent to the defect area and native skull area



注: 与原生骨组织比较, $*P < 0.05$ 。

图 4 Western blot 分析颅骨缺损区新生的骨组织及邻近的原生骨组织中 DLX2 蛋白的表达水平

Note. Compared with the native skull group, $*P < 0.05$.

Figure 4 Expression of protein DLX2 in newborn skull tissue in the tissue adjacent to the defect area and native skull area

3 讨论

颅骨作为脑组织最直接的保护屏障, 若其缺损, 对人的一生将会产生难以预测的影响^[14]。颅骨缺损在小儿中的发生并不少见, 据统计, 跌倒坠落伤、交通事故伤在所有致伤因素中所占比例最高, 依次为 56%、29%, 其次为碰撞伤(4%)、砸伤(1%)及其他原因不明因素伤(9%)^[15]。尽管在小儿颅骨缺损方面的研究如火如荼, 但大多局限于宏观方面, 由于其相比成人有一定的年龄特殊性, 其按照成人修补方式进行修补的弊端也是显而易见的, 例如覆盖式修复可能限制颅骨发育, 非降解材料填充修复可能致骨窗边缘和修复材料的对抗, 均可导致颅骨发育畸形^[16], 所以, 小儿颅骨缺损修补给临床医生增加了难度。与其他部位骨质缺损相似, 若想进行颅骨缺损修复, 也可利用一系列的分子机制进行调控等。

颅骨组织由细胞、纤维和基质构成, 骨细胞是骨组织的主要细胞, 而一个成骨细胞在 3~4 d 内可分泌其三倍体积的基质, 然后自身埋于其中, 即变为骨细胞^[17], 所以成骨细胞在骨组织的生长发育、

骨量平衡的调节中发挥着关键作用。*Dlx2* 调控生物体头颅颌面部骨骼的发育^[18-19], 在成骨细胞增殖、分化和成熟过程中起作用, 可能直接参与骨细胞功能调控和骨形成过程^[12]。有学者指出, *Dlx2* 的表达可以诱发钙黏蛋白和神经细胞黏附因子的高表达, 使神经嵴细胞黏附性增加, 出现细胞的聚集, 促进骨的生成^[20]。本实验发现 *Dlx2* 在颅骨缺损区的新生骨组织中更高, 与以上学者的研究结果一致。本实验通过检测颅骨缺损区的新生骨组织及其邻近的原生骨组织中 *Dlx2* 的 mRNA 表达水平发现, 在两个区域中存在差异表达, 与此同时, DLX2 蛋白表达在颅骨缺损区的新生骨组织中表达增加。结果提示 *Dlx2* 表达增加与颅骨缺损区颅骨组织的新生可能密切相关。

从微观分子方面入手, 研究调控颅骨生长的相关因子及机制, 利用分子生物学的方法探索小儿颅骨缺损修补的新手段, 尚有很大的探寻空间^[21]。据报道, *DLX2* 应该是成骨分化过程中一个关键分子^[4, 22-24], 在 *Dlx2* mRNA 的 3' 端中有一个假定的 mir-539 结合序列, *Dlx2* 作为 mir-539 的一个目标基因, mir-539 可以通过靶向 *Dlx2* 参与成骨前细胞分化^[20]。本研究结果提示, 在新生的颅骨组织和其邻近的原生骨组织中 *Dlx2* 表达存在差异, *Dlx2* 的相对高表达主要表现在颅骨缺损区域新生骨组织的 *Dlx2* mRNA 和 DLX2 蛋白等分子水平, 在此过程中, *Dlx2* 的骨基质形成和成骨分化均有助于颅骨缺损区的组织生长, 促进颅骨缺损的修复。因此, 笔者猜测, 可以将 *Dlx2* 作为调节颅骨缺损修复新的治疗研究靶点。

本实验研究结果显示, 颅骨缺损区新生的骨组织 *Dlx2* 的表达较其邻近的原生骨组织高, 笔者推测, *Dlx2* 可能对颅骨缺损的修复起着重要作用^[22-24]。在未来的研究中, *Dlx2* 可能作为骨代谢和骨生长新的靶点, 对其具体的调控通路和调控机制进行更深入的探索。由于本实验只是检测了 10 对小尾寒羊的颅骨组织标本, 样本量相对有限; 而且, 本实验采用小尾寒羊作为研究对象, 与人类毕竟不是同一物种, 可能存在物种差异性。只有将这些问题充分地解决好, 才能真正有可能将这些科研成果应用于临床上小儿颅骨缺损的修补。

参考文献:

[1] Lord-Maes J, Obrzut J E. Neuropsychological consequences of traumatic brain injury in children and adolescents[J]. J Learn

Disabil, 1996, 29(6):609-617.

- [2] 庄亚瑟, 方志成, 刘伯毅, 等. 基于 CT 灌注评价早期钛网修补颅骨缺损对脑血流量及神经功能康复的影响: 随机对照临床试验 [J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(26):4228-4233.
- [3] 陈俊, 周赤忠, 刘融. 颅骨修补材料运用现状及 3D 打印技术在其制备工艺中的应用展望 [J]. 中国临床神经外科杂志, 2017, 22(8):597-600.
- [4] Sun H, Liu Z, Biao L I, et al. Effects of DLX2 overexpression on the osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells [J]. Exp Ther Med, 2015, 9(6):2173-2179.
- [5] Miyama K, Yamada G, Yamamoto T S, et al. A BMP-Inducible gene, *dlx5*, regulates osteoblast differentiation and mesoderm induction [J]. Dev Biol, 1999, 208(1):123-133.
- [6] Yang G, Yuan G, Li X, et al. BMP-2 induction of *Dlx3* expression is mediated by p38/Smad5 signaling pathway in osteoblastic MC3T3-E1 cells [J]. J Cell Physiol, 2014, 229(7):943-954.
- [7] Qiu M, Bulfone A, Ghattas I, et al. Role of the *Dlx* homeobox genes in proximodistal patterning of the branchial arches: mutations of *Dlx-1*, *Dlx-2*, and *Dlx-1* and *-2* alter morphogenesis of proximal skeletal and soft tissue structures derived from the first and second arches [J]. Dev Biol, 1997, 185(2):165-184.
- [8] Qiu M, Bulfone A, Martinez S, et al. Null mutation of *Dlx-2* results in abnormal morphogenesis of proximal first and second branchial arch derivatives and abnormal differentiation in the forebrain [J]. Genes Dev, 1995, 9(20):2523-2538.
- [9] Choi Y J, Baek G Y, Park H R, et al. Smad2/3-Regulated Expression of DLX2 Is Associated with Radiation-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition and Radioresistance of A549 and MDA-MB-231 Human Cancer Cell Lines [J]. PloS One, 2016, 11(1):e0147343.
- [10] De CA, Core N, Follert P, et al. Dynamic expression of the dopaminergic transcription factors Pax6 and *Dlx2* during postnatal olfactory bulb neurogenesis [J]. Front Cell Neurosci, 2012, 6(6):6.
- [11] Azi M L, Teixeira A, Cotias R B, et al. Membrane Induced Osteogenesis in the Management of Post-traumatic Bone Defects [J]. J Orthop Trauma, 2016, 30(10):545-550.
- [12] Han J G, Su L, Zhang C Y, et al. miR-539 mediates osteoblast mineralization by regulating *Dlx2* in MC3T3-E1 cell line [J]. Open Life Sci, 2017, 12(1):294-299.
- [13] 王清云, 李渊, 战莉, 等. 实时荧光定量 RT-PCR 检测急性白血病患者骨髓 HB-1 的表达 [J]. 中国实验血液学杂志, 2018(1).
- [14] The L. The burden of traumatic brain injury in children. [J]. Lancet, 2018, 391(10123):813.
- [15] Black L I, Zammit E P, Hoffman H J, et al. Parental Report of Significant Head Injuries in Children Aged 3-17 Years: United States, 2016 [J]. NCHS Data Brief, 2018(302):1-8.
- [16] 陈拓宇, 张玉琪, 崔福斋, 等. 仿生骨材料行儿童颅骨缺损

- 修补的临床研究[J]. 中华神经外科杂志, 2016, 32(4):353-357.
- [17] Krymova TG, Kolkutin VV, Beniaev NE. Analysis of elemental composition of bone tissue by the method of laser mass spectrometry to diagnose of human medico-biological characteristics[J]. Sud Med Ekspert, 2007, 50(5):32-37.
- [18] Sun H, Liu Z, Biao LI, et al. Effects of DLX2 overexpression on the osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells[J]. Exp Ther Med, 2015, 9(6):2173-2179.
- [19] Yang G, Yuan G, Li X, et al. BMP-2 induction of Dlx3 expression is mediated by p38/Smad5 signaling pathway in osteoblastic MC3T3-E1 cells[J]. J Cell Physiol, 2014, 229(7):943-954.
- [20] Dai J, Si J, Zhu X, et al. Overexpression of DLX2 leads to postnatal condyle degradation[J]. Mol Med Rep, 2016, 14(2):1624-1630.
- [21] Kariminejad A, Bozorgmehr B, Alizadeh H, et al. Skull defects, alopecia, hypertelorism, and notched alae nasi caused by homozygous ALX4 gene mutation[J]. Am J Med Genet, 2014, 164A(5):1322-1327.
- [22] Qu B, Liu O, Fang X, et al. Distal-less homeobox 2 promotes the osteogenic differentiation potential of stem cells from apical papilla[J]. Cell Tissue Res, 2014, 357(1):133-143.
- [23] Dai J, Kuang Y, Fang B, et al. The effect of overexpression of Dlx2 on the migration, proliferation and osteogenic differentiation of cranial neural crest stem cells [J]. Biomaterials, 2013, 34(8):1898-1910.
- [24] Gordon CT, Brinas IM, Rodda FA, et al. Role of Dlx genes in craniofacial morphogenesis: Dlx2 influences skeletal patterning by inducing ectomesenchymal aggregation in ovo[J]. Evol Dev, 2010, 12(5):459-473.

[收稿日期]2018-05-14

(上接第 72 页)

参考文献:

- [1] 张洪增. 慢性萎缩性胃炎的诊治[J]. 中国全科医学, 2005, 8(12):985-987.
- [2] 段浩博, 周焕荣, 王艳艳, 等. 中医治疗慢性萎缩性胃炎临床研究进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2017, 26(12):1362-1365.
- [3] 黄杰, 章莹, 严婧, 等. 铁皮石斛多糖对脂多糖诱导的巨噬细胞免疫调节作用[J]. 中国药学杂志, 2017, 52(7):548-552.
- [4] 王立明, 徐建华, 陈立钻, 等. 铁皮枫斗晶对实验性胃阴虚证的药效学研究[J]. 中成药, 2002, 24(10):803-805.
- [5] 马津真, 吴人照, 龙华晴, 等. 铁皮石斛主要组分对慢性萎缩性胃炎模型大鼠的萎缩逆转作用及 PCNA、Bel-2 蛋白的影响[J]. 浙江中医杂志, 2017(10):760-763.
- [6] 宫媛. 大鼠胃粘膜损伤的随龄变化[D]. 中国人民解放军军医进修学院, 2008.
- [7] 田春风, 胡运莲. 胃癌前病变的防治与展望[J]. 饮食保健, 2016, 3(15):250-251.
- [8] 莫耘松, 孙晓珍, 张桂珍, 等. EGFR 和 TGF- α 在胃黏膜病变组织中的表达及 Hp 对其影响的研究[J]. 浙江临床医学, 2007, 9(4):509-510.
- [9] 马长宇. 滋阴清热良药—石斛的治疗与保健作用[J]. 健康指南: 医疗保健服务, 2014, (4):43-44.
- [10] 王杰, 王邦才. 鲜铁皮石斛临床应用举隅[J]. 浙江中医杂志, 2012, 47(11):841-842.
- [11] 刘旺根, 陈四清, 冯黎, 等. 黄芪建中汤对慢性萎缩性胃炎大鼠胃黏膜屏障功能的影响[J]. 陕西中医, 2007, 28(3):375-376.

[收稿日期]2018-04-13